

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

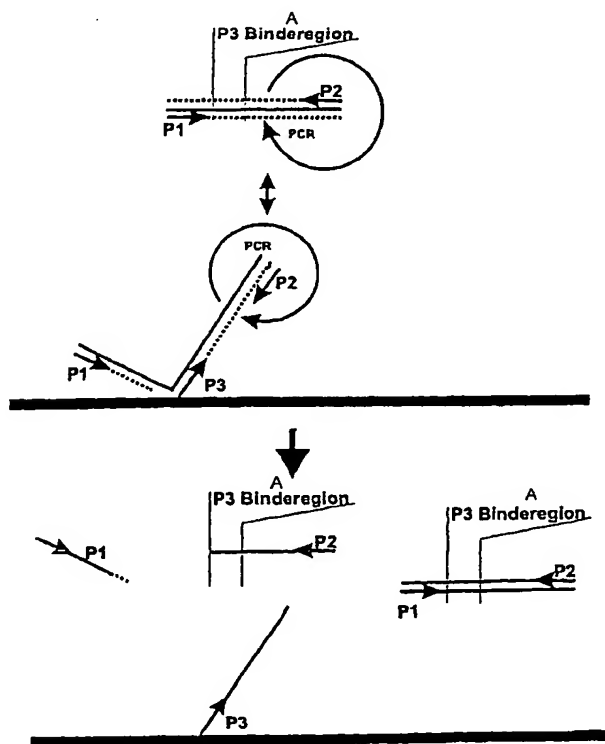
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/20833 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH** [DE/DE]; Engesserstrasse 4b, 79108 Freiburg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/10160** (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ZELTZ, Patric** [DE/DE]; St. Peter-Strasse 21, 79199 Kirchzarten (DE). **SCHNEIDER, Stephan** [DE/DE]; Prinz-Eugen-Strasse 21, 79102 Freiburg (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:
4. September 2001 (04.09.2001)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch** (74) Anwalt: **STÜRKEN, Joachim**; Patentanwaltsgesellschaft mbH, Engesserstrasse 4a, 79108 Freiburg (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:
00119182.4 5. September 2000 (05.09.2000) **EP** (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE SPECIFIC DETERMINATION OF DNA -SEQUENCES BY MEANS OF PARALLEL AMPLIFICATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SPEZIFISCHEN BESTIMMUNG VON DNA-SEQUENZEN MITTELS PARALLELER AMPLIFIKATION



(57) Abstract: The invention relates to a general method for the specific determination of DNA-sequences by means of parallel amplification using nested polymerase chain reactions in a combined liquid-/solid-phase DNA-microarray system and modifications resulting therefrom for the determination of, for example, point mutations and for sequencing partial DNA regions, which after a particular method of execution can also be unknown.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein allgemeines Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation durch verschachtelte Polymerasekettenreaktion in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarray-system, sowie davon abgeleitete Modifikationen zur Bestimmung von z.B. Punktmutationen und zum Sequenzieren von DNA-Teilbereichen, welche nach einer besonderen Ausführungsform auch unbekannt sein können.

A...BINDING REGION

WO 02/20833 A2



DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation

Die vorliegende Erfindung betrifft ein allgemeines Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation durch verschachtelte Polymerasekettenreaktion (im folgenden auch PCR = engl. "Polymerase Chain Reaction") in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem (ein solches Festphasen-Microarraysystem wird unabhängig vom konkret daran immobilisierten Biomolekül (hier DNA) allgemein auch als "Biochip" bezeichnet). Ausgehend von diesem allgemeinen Verfahren, das als solches bereits den Nachweis bestimmter Analyten in einer zu analysierenden Probe gewährleistet, betrifft die vorliegende Erfindung gleichermaßen davon abgeleitete Verfahren zur Bestimmung von Punktmutationen und allelischen Varianten sowie Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von DNA-Teilbereichen, und zwar auch von unbekannten DNA-Teilbereichen.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung wird der Begriff „parallel“ kontextabhängig mit zwei unterschiedlichen Bedeutungen verwendet. Zum einen ist z.B. die unten erwähnte parallele Bestimmung der einzelnen Sequenzbausteine durch Verwendung unterschiedlicher Primer möglich, d.h. der Multiplexbetrieb, zum anderen bedeutet „parallele“ Amplifikation unter konkreter Bezugnahme auf ein erfindungsgemäßes Verfahren die gleichzeitige Amplifikation von Nucleinsäuren sowohl in der flüssigen als auch an der festen Phase mittels erfindungsgemäß bezeichneter P₃-Primer.

Im folgenden werden die Begriffe Sonde, PCR-Primer bzw. Primer je nach der Funktion des betreffenden Oligonucleotids verwendet. Ein Oligonucleotid, das als Primer zur spezifischen Am-

Amplifikation von Zielsequenzen verwendet werden kann, kann auch als Sonde zum Nachweis der Zielsequenz verwendet werden.

Ein Festphasen-Microarraysystem und ein Verfahren zur Analyse von markierten DNA-Sequenzen durch Hybridisierung an auf einem festen Träger immobilisierte Sonden und durch Bestimmung der Lokalisierung der Markierung auf der Oberfläche ist beispielsweise aus EP 0 373 203 bekannt.

Für eine solche DNA-Microarray-Analyse sind eine Reihe von Einzelschritten nötig. So muß die Proben-Nucleinsäure direkt oder in Form einer Kopie markiert werden, oder aber es wird mit einer Fänger-Nucleinsäure auf dem Mikroarray und einer zweiten Detektionssonde in Lösung gearbeitet. Dabei ist für viele Anwendungen, wie z.B. den Nachweis von biologischen Kontaminationen, die Amplifikation der Probensequenz durch z.B. eine PCR nötig. Die (markierte) Probe wird dann mit der auf dem Mikroarray gebundenen Sonde hybridisiert, um ein spezifisches, ortsgebundenes Signal zu erzeugen, welches z.B. über eine Detektionssonde aufgenommen und weitergeleitet werden kann. Durch diese Vorgehensweise fallen viele Einzelreaktionsschritte an, die diese Analysen arbeits-, kostenintensiv, langsam und darüber hinaus fehleranfällig machen.

Die Durchführung einer PCR in Anwesenheit eines festen Trägers bzw. Chip ("PCR on Chip") ist an sich bereits bekannt (Shoffner M. A., Cheng J., Hvichia G. E., Kricka U., Wilding P.: Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR. Nucleic Acids Res. 1996 Jan 15; 24(2):375-9.; Cheng J., Shoffner M. A., Hvichia G. E., Kricka U., Wilding P.: Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. Nucleic Acids Res. 1996 Jan 15; 24(2):380-5.

Auch das Prinzip der sog. verschachtelten PCR (engl. "nested PCR") ist bekannt (vgl. z.B. C. R. Newton, A. Graham: "PCR", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford 1994, S. 59 und die dort angegebenen weiteren Literaturstellen). Bei der verschachtelten PCR werden zwei PCR-Primer-Paare verwendet, von denen die Mitglieder eines Paares (die sog. äußeren PCR-Primer) stromaufwärts bzw. stromabwärts der zu amplifizierenden Ziel-DNA-Sequenz hybridisieren. Die Mitglieder des zweiten Primer-Paares (die sog. inneren PCR-Primer) hybridisieren innerhalb des Abschnitts, der vom Design des ersten Primer-Paares vorgegeben wird. Der Vorteil dieser Technik besteht in der erheblichen Erhöhung der Empfindlichkeit und der Spezifität, da bevorzugt die Ziel-DNA-Sequenz amplifiziert wird.

Diese Technik ist aber außerordentlich empfindlich gegenüber Verunreinigungen, wie sie beispielsweise auch durch das Zusammenpipettieren der für die PCR erforderlichen Reagenzien eingeschleppt werden können. Bei einer verschachtelten PCR muß ferner eine räumlich und/oder zeitlich getrennte Amplifikation erfolgen, d.h. z.B., daß entweder das erste Amplikon verdünnt oder mindestens einer der äußeren Primer entfernt werden müssen. Im allgemeinen wird die Verdünnungsmethode angewendet, bei der die Konzentration der ursprünglichen Matrize und die Konzentration mindestens eines der äußeren Primer (nachfolgend mit P_1 bzw. P_2 bezeichnet) stark vermindert wird. Ein Hinzupipettieren ist nach der ersten Amplifikation im Prinzip zwar möglich, jedoch mit dem Risiko verbunden, daß die der „nested PCR“ normalerweise innewohnenden Vorteile (s.o.) nicht realisiert werden können. Ferner ist dem Fachmann bekannt, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit aller drei Primer in dem Ansatz keine Erhöhung der Empfindlichkeit und der Spezifität mehr er-

reicht werden kann, weshalb von einer verschachtelten PCR im eigentlichen Sinne auch nicht mehr gesprochen werden kann (s. z.B. WO 96/26291). Deshalb beschreiben die WO 90/11369, die WO 96/31622, die WO 93/21339, sowie die WO 98/28438 Verfahren, bei denen die Amplifikationsrunden räumlich und/oder zeitlich getrennt ablaufen.

Es ist ferner versucht worden, die PCR-Reagenzien vorzumischen und entsprechend zu stabilisieren, insbesondere um die Durchführung der PCR-Reaktion zu vereinfachen. Im Stand der Technik ist jedoch nicht beschrieben, dass die Reaktionsteilnehmer der vorgesehenen Umsetzung direkt auf einer Microarrayanordnung in dehydratisierter Form bereitgestellt werden, so daß die Reaktion nur noch durch Zugabe der vorzugsweise wäßrigen Probenlösung gestartet werden kann.

Im Stand der Technik sind unterschiedliche Techniken zur Lyophilisierung bzw. Trocknung von Reagenzien für die Durchführung von Nucleinsäure-Analysen beschrieben. So wird im US-Patent 5 565 318 die Herstellung von Semisphären mit allen für eine Reaktion nötigen Komponenten, darunter auch Nucleinsäuren, beschrieben. Ähnliche Techniken werden in den Anmeldungen FR 2 674 253, EP 0 298 669, EP 0 726 310, GB 2 333 358, WO 94/17106, WO 98/00530, US 5 250 429 und EP 0 383 569 angewendet.

In der Patentanmeldung WO 96/32497 werden konkret alle wichtigen Nucleinsäure-Techniken in Bezug auf die Verwendung solcher Reagenziensphären beschrieben. In der Patentanmeldung WO 94/16107 ist zusätzlich noch ein Apparat bzw. eine Vorrichtung erwähnt, bei dem die getrockneten Reagenzien zu einer Sequenzierungsreaktion auf einer Platte (vermutlich einer Microtiterplatte) verwendet werden. In der Patentanmeldung WO

96/17083 wird ein fester Träger in Form eines Kammes beschrieben, auf dem sich diese Reagenzien befinden und der auf sog. 8-ter Strips bzw. Microtiterplatten gegeben werden kann, so daß nach der Ablösung der Reagenzien die Reaktion in den
5 Vertiefungen der Microtiterplatten ablaufen kann.

In der Patentanmeldung WO 93/14223 wird die Aufbringung der einzelnen PCR-Reagenzien in Form von räumlich voneinander getrennten Flecken ("Spots") bzw. auch eine flächige Aufbringung
10 an eine feste Phase in Form eines Objektträgers offenbart. Ferner wird die reversible Bindung getrockneter Markierungssubstanzen und die Markierung einer Sonde nach der Rehydrierung beschrieben. Die Sonde bzw. Sonden-Nucleinsäure selbst liegt hierbei aber ausdrücklich reversibel an den festen Trä-
15 ger gebunden vor.

Keine dieser im Stand der Technik beschriebenen Techniken ermöglicht die parallele Amplifikation in einem gekoppelten Flüssig-/Festphasen PCR-System, bei dem die gewünschten Ergeb-
20 nisse durch Auswertung eines direkt an der festen Phase des Systems nachweisbar gebildeten und damit kovalent gebundenen Extensionsprodukts hoch-spezifisch, mit hohem Durchsatz und reproduzierbar - gewünschtenfalls auch in Echtzeit - generiert und den unterschiedlichen Anwendungsgebieten zugeführt werden
25 können.

Aufgabe der Erfindung ist, die dem Stand der Technik anhaftenden Mängel zu beseitigen und ein einfaches und fehlerfrei zu handhabendes und preisgünstiges Verfahren zur Amplifikation
30 und Analyse von DNA-Sequenzen bereitzustellen, ohne das Kompromisse hinsichtlich der Empfindlichkeit und Spezifität zu machen sind.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein allgemein anwendbares Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem, indem man
5 eine verschachtelte Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von x PCR-Primersätzen aus jeweils mindestens 3 PCR-Primern P_{11} , P_{21} , P_{31} , P_{12} , P_{22} , P_{32} , P_{13} , P_{23} , P_{33} , ... P_{1x} , P_{2x} , P_{3x} durchführt, wobei x eine natürliche Zahl bedeutet und der Anzahl der zu bestimmenden DNA-Sequenzen entspricht, und wobei
10 für jeden der x PCR-Primersätze

(a) zwei äußere PCR-Primer P_1 , P_2 so ausgewählt werden, daß sie an stromaufwärts und stromabwärts der zu amplifizierenden Ziel-DNA-Sequenz liegende DNA-Teilsequenzen hybridisieren,
15

(b) ein innerer PCR-Primer P_3 so ausgewählt wird, daß er an eine innerhalb der zu bestimmenden Ziel-DNA-Sequenz liegende DNA-Teilsequenz hybridisiert und in der Lage ist, ein P_3 -Extensionsprodukt zu bilden, und
20

(c) die x äußeren PCR-Primer P_{11} , P_{21} , P_{12} , P_{22} , P_{13} , P_{23} , ... P_{1x} , P_{2x} in der flüssigen Phase gegenüber den x inneren PCR-Primern P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} im Überschuß vorliegen, und

25 (d) die x inneren PCR-Primer P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} an x räumlich beabstandeten definierten Positionen unter Bildung eines DNA-Microarrays irreversibel an eine Festphase gebunden vorliegen, und

30 (e) man die Bestimmung durch Ermittlung des Vorhandenseins eines P_3 -Extensionsproduktes an der definierten Position des DNA-Microarrays durchführt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich u.a. die nachfolgend dargelegten Vorteile erzielen. Die verschachtelten PCR-Reaktionen laufen direkt und parallel auf dem Festphasen-DNA-Mikroarray ab. Das bei der Durchführung einer konventionellen verschachtelten PCR in flüssiger Phase üblicherweise erforderliche Verdünnen und Neueinstellen des Reaktionsansatzes nach der ersten PCR unter Verwendung der äußeren Primer P_1 und P_2 entfallen. Für den Anwender des vorliegend beschriebenen Verfahrens fällt zur Durchführung der gesamten Analyse nur noch ein Arbeitsschritt an, d.h. er muß nur noch die Proben-Nucleinsäuren und die PCR-Reagenzien (DNA-Polymerase und Desoxynucleosidtriphosphate in PCR-Puffer) zupipettieren, sofern diese Reagenzien vollständig oder zum Teil nicht bereits nach einer bevorzugten Ausführungsform in dehydratisierter Form auf dem festen Träger bereitgestellt werden. Dadurch sinken sowohl der Arbeitsaufwand als auch die Kontaminationsgefahr signifikant bei deutlicher Reduktion der Fehlermöglichkeiten.

Insbesondere im Rahmen von Anwendungen, bei denen nur sehr geringe Target-DNA-Mengen zur Analyse zur Verfügung stehen, ist es also wichtig, die Sensitivität einer Standard-PCR zu erreichen. Ferner wird die bei typischen Multiplex-Anwendungen geforderte Spezifität für die verschiedenen, parallel ablaufenden Reaktionsschritte unbedingt zu gewährleisten sein, um sowohl falsch-positive wie auch falsch-negative Detektionsergebnisse auszuschließen.

Um eine Kombination dieser Anforderungen zu gewährleisten, wird daher, wie nachfolgend detailliert ausgeführt, vorgeschlagen, mit mindestens drei Primern zu arbeiten, wobei nur der Detektionsprimer P_3 an der Festphase bzw. Detektionsfläche gebunden ist und für eine wichtige Selektion der im Gesamtansatz vorhandenen Amplikons sorgt, wodurch die gewünschte hohe

Spezifität überhaupt erst ermöglicht wird. Diese die Spezifität gegenüber herkömmlichen Verfahren deutlich steigernde Ausführungsform wird ferner dadurch erreicht, dass sich die in der flüssigen Phase befindlichen äußeren Primer P_1 und P_2 gegenüber den festphasengebundenen Detektionsprimern P_3 im Überschuss befinden. Mit anderen Worten wird die Spezifität des Nachweises dadurch gewährleistet, dass nur solche Nukleinsäuresequenzen an der festphasengebundenen PCR teilnehmen können, welche sich zuvor durch die ebenfalls im Ansatz vorhandenen äußeren Primer „qualifiziert“ haben. Damit wird zum einen sichergestellt, dass auch geringste Target-DNA-Mengen ausreichend amplifiziert werden und damit der Detektion zur Verfügung stehen. Zum anderen wird durch die Konzentrationsunterschiede zwischen den Primern P_1/P_2 und dem Primer P_3 und der gegenüber der Flüssigphasen-PCR benachteiligten Erreichbarkeit eines festphasengebundenen Detektionsprimers für ein amplifizierbares DNA-Target überraschenderweise gewährleistet, dass im wesentlichen nur auf die interessierende Target-Sequenz vorselektierte Nukleinsäuren an der Detektion teilnehmen können.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation durch verschachtelte PCR in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem besitzt demgemäß die gleiche Empfindlichkeit wie eine konventionelle, d.h. in flüssiger Phase durchgeführte, PCR und gleichzeitig eine höhere Spezifität als Hybridisierungsassays und Primer-Extensionassays. Der Grund dafür ist, daß die dem System Primer/Proben-DNA/Polymerase eigene Spezifität in bezug auf die Amplifikation zusätzlich noch durch die spezifische Wechselwirkung zwischen dem an den festen Träger immobilisierten inneren PCR-Primer (der somit auch die Funktion einer Sonde hat) und dem Amplikon deutlich erhöht

wird. Insgesamt resultiert so eine Spezifität, die z.B. derjenigen eines 5'-Exonuklease-Assays (z.B. TaqManTM-PCR-Technologie) überlegen ist.

- 5 Diese Vorteile lassen sich mit einem einfachen Festphasenprimer-Extensionassay, wie z.B. der Mikrotiterplatten-Festphasen-PCR (Nunc, vgl. z.B. NucleoLinkTM) oder der "BridgeTM-PCR" (Mosaic Technologies, vgl. z.B. WO 98/36094 und WO 96/04404), nicht erzielen.

10

Durch die ortsgebundenen inneren PCR-Primer, die auch als Sonden fungieren, kann nach einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung auf dem Mikroarray mit einem Markierungsreagenz (beispielsweise unter Verwendung markierter Nucleotide) gearbeitet werden, um parallel viele unterschiedliche
15 Sequenzen, Merkmale oder Eigenschaften zu untersuchen.

Eine markierungsfreie Detektion, beispielsweise mit optischen oder anderen physikalischen Methoden ist aber ebenfalls möglich, d.h. das erfindungsgemäße Verfahren kann auch ohne markierte Nukleotide durchgeführt und die Reaktionsprodukte gemessen werden.
20

Hier zeigt das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber den konventionellen Hybridisierungsverfahren des Standes der Technik, bei denen unspezifische Massezuwächse an der Oberfläche des festen Trägers ein Problem darstellen, den Vorteil, daß der unspezifische Massezuwachs an der Oberfläche durch Anwendung hoher Temperaturen stark vermindert wird, wobei die kovalente
25 Bindung der spezifischen Extensionssprodukte an den Festphasenprimer P₃ für eine nahezu ausschliessliche Bestimmung der gewünschten Spezifität sorgt.
30

Die Messung eines ortsspezifischen Massezuwachses kann z.B. durch physikalische Methoden erfolgen. Beispielsweise kann die ortsspezifische Änderung des Brechungsindex, die ortsspezifische Änderung des elektrischen Widerstandes bzw. der elektrischen Leitfähigkeit, die ortsspezifische Änderung der optischen Dichte oder auch ortsspezifische dichroische Effekte, etc. gemessen werden.

Grundsätzlich ist das allgemeine erfindungsgemäße Verfahren für ein breites Spektrum an Anwendungsgebieten geeignet, wobei zwischen reinem diagnostischen Nachweis bestimmter Analyten in einer zu analysierenden Probe einerseits und komplexer abgeleiteten Modifikationen des Verfahrens zur Ermittlung von Sequenzdaten oder Informationen über funktionelle Zusammenhänge im Rahmen entsprechender Genomik- bzw. Proteomik-Fragestellungen unterschieden werden kann. Diese Unterscheidung dient jedoch nur der Veranschaulichung und soll die grundsätzlich offene Anwendbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens in keiner Weise beschränken.

20

Nach einer besonderen Ausführungsform umfasst das allgemeine Verfahren der vorliegenden Erfindung daher ein davon abgeleitetes Verfahren insbesondere zur Bestimmung von Punktmutationen mittels paralleler Amplifikation, bei dem man

25

(a) unter Anwendung des oben definierten erfindungsgemäßen Verfahrens eine Polymerasekettenreaktion durchführt, durch welche sämtliche x zu bestimmenden Varianten amplifiziert werden, wobei

30

(b) mindestens P_3x Primerfamilien verwendet werden, wobei sich jedes einzelne Mitglied P_{3x-N} der Primerfamilie hinsichtlich des Nukleotids an seinem 3'-Ende von jedem anderen Mit-

glied unterscheidet, wobei N die unterschiedlichen Nukleotide A, C, G und T bezeichnet, und die Annealingtemperatur der Amplifikationsreaktion so ausgewählt wird, daß die gewünschten Extensionsprodukte nur an denjenigen definierten Positionen des DNA-Microarrays gebildet werden, welche durch die Anwesenheit des zu der zu bestimmenden Punktmutation im wesentlichen exakt komplementären Primers gekennzeichnet sind,

(c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Bestimmung der Punktmutation gemäß Schritt (e) des oben definierten erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt.

Die Angabe "im wesentlichen exakt komplementärer Primer" bedeutet hier, daß hybridisierte und von der DNA-Polymerase als Matrize (engl. "Template") akzeptierte Primer verlängert werden, d.h. in der Regel sind im Bereich des 3'-Endes sämtliche Nukleotide komplementär zur Matrize.

Ferner umfasst das allgemeine Verfahren der vorliegenden Erfindung ein davon abgeleitetes Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von DNA-Teilbereichen mittels paralleler Amplifikation, bei dem

(a) unter Anwendung des oben definierten erfindungsgemäßen Verfahrens eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird, durch welche sämtliche x zu bestimmenden Sequenzen amplifiziert werden, wobei

(b) mindestens P_3x Primerfamilien verwendet werden, wobei sich jedes einzelne Mitglied $P_3x-N, \dots P_3x-N_n$ der Primerfami-

lie hinsichtlich seiner 1 bis n Nukleotide am 3'-Ende von jedem anderen Mitglied unterscheidet, wobei N die unterschiedlichen Nukleotide A, C, G und T bezeichnet, und n die Länge der zu bestimmenden Sequenz(en) angibt, und die Annealingtemperatur der Amplifikationsreaktion so ausgewählt wird, daß die gewünschten Extensionsprodukte nur an denjenigen definierten Positionen des DNA-Microarrays gebildet werden, welche durch die Anwesenheit des zu der zu bestimmenden Sequenz im wesentlichen exakt komplementären Primers gekennzeichnet sind,

10

(c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Ermittlung der zu bestimmenden Sequenz(en) gemäß Schritt (e) des oben definierten allgemeinen erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt.

Obwohl sich die Anwendungsbereiche der ersten beiden abgeleiteten Modifikationen des allgemeinen erfinderischen Verfahrens durchaus unterscheiden können, erfolgt die Ermittlung im wesentlichen gleich. Zwar soll im abgeleiteten Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von DNA-Teilbereichen mehr als nur das endständige 3'-Nukleotid bestimmt werden, aber durch das bekannte Design des Mikroarrays und die Gruppierung der einzelnen Reaktionsbereiche in Felder, die mit der ersten, zweiten, dritten ... bzw. n-ten Position der zu bestimmenden Sequenz korrespondieren, erfolgt die Bestimmung des DNA-Teilbereichs durch sukzessives Ablesen der für jedes Feld erhaltenen Daten. Mit anderen Worten wird zuerst das Feld ausgewertet, in welchem ausgehend vom Design des Arrays die erste zu bestimmende Base ermittelt wird, bevor in Kenntnis des Ergebnisses aus diesem ersten Feld die Bestimmung der Base an der zweiten Po-

sition der zu ermittelnden Sequenz vorgenommen wird, u.s.w. Die jeweilige Untersuchung eines Feldes erfolgt vorzugsweise durch Erfassung und Zuordnung der größten gemessenen Signalstärke. Selbstverständlich können die Feldmessungen auch parallelisiert ablaufen. Ergänzend wird in diesem Zusammenhang auf Abb. 3 verwiesen.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das allgemeine Verfahren ferner ein Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von unbekannten DNA-Teilbereichen mittels paralleler Amplifikation, bei dem

(a) unter Anwendung des oben definierten allgemeinen erfindungsgemäßen Verfahrens eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird, durch welche die Abfolge sämtlicher n Nukleotide der zu bestimmenden Sequenzen ermittelt wird, wobei

(b) ein sämtliche Permutationen umfassender Satz von inneren Primern P_3 mit einer bestimmten Länge n verwendet wird, wobei mehrere Primer mit einer jeweils unterschiedlichen Region der zu bestimmenden Sequenz exakt hybridisieren und Extensionsprodukte definierter Länge bilden können, und sich jeder einzelne dieser Primer an einer anderen definierten Position des DNA-Microarrays befindet,

(c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Bestimmung der Sequenz durch Ermittlung der in Schritt (b) gebildeten Extensionsprodukte, Zuordnung dieser ermittelten Werte zu den definierten Positionen des DNA-Microarrays, und Zusammenstellung der zu bestimmenden Sequenz

im Rahmen einer ggf. Computer-unterstützten Kombinatorik erfolgt, wobei die tatsächliche Aneinanderreihung der Einzeldaten zur Gesamtsequenz unter Nutzung der jeweils überlappenden Sequenzbereiche vorgenommen wird.

5

Alternativ kann eine Konsensus-PCR auch durch das Anligieren von PCR-Adaptoren erfolgen. Damit wird eine Signatur-Sequenzierung ausgehend von einem "Pool" an cDNA Sequenzen erreicht (auch quantitativ ausführbar im Falle einer Online-
10 Beobachtung der Amplifikation). Ein solches Sequenzierungsverfahren (MPSS = engl. "Massively Parallel Signature Sequencing") wurde kürzlich beschrieben (Brenner et al., Nature Biotechnology Vol. 18 June 2000, Seiten 630-34) und kann unter Berücksichtigung der vorliegend offenbarten technischen Lehre
15 auf sehr viel einfachere Weise durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren erfordert hierzu lediglich die cDNA-Generierung, einen Restriktionsverdau und die Adaptorligation vor dem Assay. MPSS erfordert im Gegensatz dazu die cDNA-Herstellung, einen Restriktionsverdau, die anschließende Hy-
20 bridisierung an "Beads", die "FACS"-Sortierung (FACS = engl. Fluorescence-activated Cell Sorter) der "Beads" und eine Wiederholung der Ligation sowie Restriktionsverdauschritte.

Dem Fachmann sind die grundsätzlichen Schritte der Sequenzermittlungen aus der allgemeinen Literatur zur „Sequencing by Hybridization“-Technologie bekannt (vgl. z.B. EP 0 373 203).
25 Im übrigen wird zur Veranschaulichung des geschilderten Verfahrens auf die Abbildungen 4 und 5 verwiesen.

30 Nach einer alternativen Ausführungsform dieses Verfahrens erfolgt die Bestimmung der Sequenz durch Ermittlung der jeweiligen Längen der in Schritt (b) gebildeten Extensionsprodukte.

und Zuordnung der ermittelten Werte zu den definierten Positionen des DNA-Microarrays.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das zuvor beschriebene Verfahren auch zur Signatur-Sequenzierung und Quantifizierung ausgehend von einer unbekannten Sequenz mittels Primern erfolgen, welche mindestens 9 Nukleotide aufweisen.

- 10 Unbekannte Sequenzen werden hierzu mit einem Restriktionsenzym geschnitten, Adaptorprimer anligiert und die Ligationsprodukte von der restlichen DNA separiert und z.B. mittels Nonamerprimern auf und an dem Chip amplifiziert. Zum Beispiel werden die cDNAs eines kompletten bakteriellen RNA-"Pools" bestimmt. Das
- 15 Amplikon umfaßt vorzugsweise 18-25 bp. Die Festphasenprimer sind alle 9 Nucleotide lang und unterscheiden sich in ihrer Sequenz. Es sind 262144 unterschiedliche Primervarianten auf der Festphase. Wiederum werden Standard-PCR-Bedingungen angewandt, aber die Annealingtemperatur wird nach 10-20 Zyklen auf
- 20 30-50°C erniedrigt, um die Festphasen-Amplifikation mit den Nonameren zu begünstigen. Nur exakt komplementäre Primer werden verlängert. Das entstandene Muster nach Anfärbung erlaubt durch Abgleich mit üblichen Datenbanken die Sequenzbestimmung.
- 25 Somit wird die Sequenzermittlung von Produkten des "SAGE"-Verfahrens ermöglicht (Velculescu V. E. et al., Science 1995, Vol. 270, Seiten 484-87; Neilson, L. et al., Genomics 2000, Vol 63, Seiten 13-24) Durch Online-Detektion kann die Ausgangsmenge der cDNAs bestimmt werden.

30

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung einen Festphasen-DNA-Microarray zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, auf dem an n räumlich beabstandeten Positionen x in-

nere PCR-Primer P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} irreversibel an die Festphase gebunden sind.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von DNA-Teilbereichen mittels paralleler Amplifikation lassen sich die Nachteile der Sequenzierungsverfahren des Standes der Technik beheben, nämlich unter anderem die durch die grundsätzliche Linearität einer solchen Methodik vermittelte geringe Empfindlichkeit.

Beispielsweise findet beim sog. "Cycle Sequencing" nur eine Amplifikation in der flüssigen Phase statt, so daß die Trennung der Sequenzierungsprodukte nötig ist, was Fehlermöglichkeiten beinhaltet und arbeitsaufwendig ist.

Beim sog. "Mini Sequencing" (nach der Sanger'schen Dideoxy-Sequenziertechnik) muß dagegen die Matrize bzw. das "Template" in großer Menge verwendet werden, da nur Dideoxynucleotide (ddNTPs) verwendet werden, so daß lediglich eine lineare Amplifikation stattfindet.

Beide beispielhaft beschriebenen Sequenzierungstechniken weisen gegenüber dem erfindungsgemäßen Verfahren den Nachteil auf, dass eine gleichzeitige, d.h. parallele Amplifikation der zu bestimmenden Matrize nicht möglich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist im übrigen dadurch von den bekannten Verfahren wie insbesondere der "Sequencing-by-Hybridisation"-Technik (wie z.B. in EP 0 373 203 beschrieben) abgegrenzt, daß nicht ein gesamtes Amplikon, sondern gezielt nur relevante Bereiche davon sequenziert werden können. Darüber hinaus ermöglicht das Verfahren eine gleichzeitige Bestimmung der Sequenz mehrerer interner Regionen des Amplikons.

Zur SNP-Ermittlung (engl. "Single Nucleotide Polymorphism") durch Hybridisierung oder unter Anwendung der ARMS-Technik (engl. "Amplification Refractory Mutation System", vgl. z.B. P. Scheinert: Nachweis von Mutationen; BioTec Labortechnik, 5/6/1998) muß die betreffende Sequenz bekannt sein. Außerdem
5 wird ein sog. "Fehl-Priming" nicht erkannt. Ein Multiplexbetrieb (parallele Durchführung unter Verwendung mehrerer verschiedener Primer) ist aufgrund der Generierung von Extensionsprodukten gleicher Länge nicht möglich, so daß getrennte
10 Ansätze zwingend sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Punktmutationen mittels paralleler Amplifikation hat demgegenüber insbesondere die nachfolgend dargestellten Vorteile.

15

Die Sequenzen der zu ermittelnden 3'-Basen müssen nicht (können aber) bekannt sein. Außerdem müssen keine terminierenden Agenzien verwendet werden (wie bei der Sanger'schen Dideoxy-Sequenzieretechnik), und es ist die parallele Bestimmung der
20 einzelnen, verschiedene SNP differentiell charakterisierenden, Sequenzbausteine möglich, d.h. der Multiplexbetrieb.

Die Empfindlichkeit ist sehr hoch (1 Kopie wird erkannt), damit minimalsten Matrizenmengen (1 Kopie reicht) mit Hilfe exponentieller Amplifikation sequenziert wird.
25

Weitere vorteilhafte und/oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

30 Im folgenden wird die Erfindung ohne Beschränkung anhand von Ausführungsbeispielen und unter Bezugnahme auf die in den Figuren dargestellten Abbildungen detaillierter beschrieben.

In den Figuren zeigt:

Abb. 1: den spezifischen Nachweis einer bekannten Sequenz.

5 Abb. 2: eine Allotypbestimmung durch spezifische Bestimmung der Identität eines 3'-ständigen Nucleotids mittels Primerfamilien.

10 Abb. 3: eine sog. "Sequence Tag Aquisition", d.h. eine spezifische Signatur-Sequenzierung ausgehend von einer bekannten Primersequenz mittels Primerfamilien.

Abb. 4: eine Signatur-Sequenzierung ausgehend von einer unbekannten Sequenz mittels Primer-Hexameren.

15

Abb. 5: das Zusammenführen der durch die Signatur-Sequenzierung gemäß Abb. 4 erhaltenen Einzelergebnisse zur Generierung einer kontinuierlichen Sequenzabfolge.

20 Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation liegen die x äußeren PCR-Primer P_{11} , P_{21} , P_{12} , P_{22} , P_{13} , P_{23} , ... P_{1x} , P_{2x} gegenüber den x inneren PCR-Primern P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} in einem 10^2 - bis 10^{12}
25 -fachen, z.B. in einem 10^4 -fachen, Überschuß vor. Dadurch läuft die PCR am Anfang verstärkt in der flüssigen Phase ab. Mit zunehmender Amplikon-Konzentration findet die PCR aber zunehmend auf der Festphasenoberfläche statt und entspricht dort einer verschachtelten PCR.

30

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation sind die Schmelz-

temperaturen (T_m) der zwei äußeren PCR-Primer P_1 und P_2 gegenüber derjenigen des inneren Primers P_3 unterschiedlich. Beispielsweise haben die äußeren PCR-Primer eine höhere Schmelztemperatur als der innere PCR-Primer. Der Reaktionsverlauf
5 kann dann so eingestellt werden, daß zunächst bei erhöhter Temperatur nur die äußeren PCR-Primer binden bzw. "annealen" und verlängert werden. Nach der entsprechenden PCR-Zyklenzahl wird dann die Temperatur gesenkt, so daß auch der innere PCR-Primer an sein "Template" binden und die für die Bestimmung
10 gewünschten Extensionsprodukte bilden kann.

Auch die verschiedenen Festphasenprimer P_3 untereinander können unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen. Daher ist es möglich, die Reaktion so zu steuern, daß nur an bestimmten
15 definierten Positionen des DNA-Microarrays eine Amplifikation stattfindet. Durch die Erstellung von Amplifikationsprofilen können gewünschtenfalls die unterschiedlichen Eigenschaften der Festphasenprimer wie z.B. Basenzusammensetzung, G-C Gehalt und Länge berücksichtigt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation unterliegt die Festphase bzw. der feste Träger keinen besonderen Beschränkungen und kann beispielsweise unter Metall(z.B. Aluminium oder
25 Gold)oberflächen, mit SiO_2 bedampften Metall-oberflächen, Metall/Halbmetalloxid(z.B. Al_2O_3 oder SiO_2)oberflächen, Glasoberflächen, Polymeroberflächen, z.B. in Folienform, Nylonmembranen oder Nitrocellulosemembranen ausgewählt werden. Dem Fachmann ist aber klar, daß sich grundsätzlich auch "halbfeste"
30 oder gelartige Träger eignen. Wichtig ist nur, daß eine örtliche Fixierung bzw. räumliche Lokalisierung der Nachweisreaktion möglich ist.

Ein erfindungsgemäß bevorzugt geeigneter gelartiger Träger kann z.B. hergestellt werden, indem auf einem herkömmlichen festen Träger an sich bekannte Polymerisationsinitiatoren immobilisiert werden, an die dann entsprechende Monomere unter
5 Bildung von sog. "Polymer Brushes" polymerisiert werden. Diese Monomeren können zum einen funktionelle Gruppen aufweisen, über die eine Vernetzung der "Polymer Brushes" miteinander möglich ist, und zum anderen funktionelle Gruppen haben, die zur Immobilisierung von Sonden-Molekülen, z.B. Oligonucleotiden
10 oder Antikörpern, dienen (Linker-Gruppen). In wässriger Phase quillt die Schicht aus "Polymer Brushes" auf der Oberfläche des festen Trägers gelartig auf. Mit "Polymer Brushes" lassen sich erheblich höhere Propfdichten auf der Trägeroberfläche erreichen als unter Verwendung der konventionellen, sich
15 selbst organisierenden Monoschichten (engl. "Self-assembled Monolayers", "SAMs") aus bifunktionellen Molekülen (engl. "Linker"). Auch die Kopplungsdichte in bezug auf die Proben- oder Sondenmoleküle ist erheblich höher. Einzelheiten zur "Polymer-Brush"-Technik sind in der WO 00/43539 beschrieben, auf
20 die hier ausdrücklich Bezug genommen wird.

Bevorzugt wird Glas verwendet, da es keine poröse Oberfläche hat, in deren Poren die Ziel-DNA diffundieren könnte und dadurch langsamer ihre entsprechende Sonde findet. Außerdem ist
25 Glas mechanisch stabil, temperaturbeständig, unempfindlich gegenüber stringenten Waschbedingungen und hat eine geringe Eigenfluoreszenz. Es sind alle Glasarten oder -sorten geeignet, z.B. Quarzglas.

30 Die Polymeroberfläche kann z.B. aus Polypropylen, Polymethylmethacrylat (PMMA) (Acryl- bzw. Plexiglas) oder Cycloolefin-Copolymeren (COCs) bestehen. Ein geeignetes COC ist beispielsweise von Ticona unter dem Handelsnamen "Topaz" erhältlich.

Die genauen Sequenzen der äußeren und inneren Primer bzw. Sonden wählt der Fachmann nach Maßgabe des konkreten analytischen Problems. Beispielsweise kann es sich um Sequenzen handeln, die an für die nachzuweisenden oder zu differenzierenden Mikroorganismen spezifische DNA-Sequenzen hybridisieren. Organismenspezifische Sequenzen können beispielsweise durch Sequenzdatenbankvergleiche und ggf. "Alignment" ermittelt werden. Grundsätzlich besteht keine Beschränkung auf DNA oder allgemein Nucleinsäuren als Sonden. Es können wegen der bekannten Vorteile auch DNA-PNA (Peptidnucleinsäure)-Hybride bzw. -Chimäre verwendet werden. Ferner können auch modifizierte Nucleotide (z.B. dI, dI-Biotin, dU, dU-Biotin) eingesetzt werden.

Die direkte oder indirekte Immobilisierung der Biomoleküle mit oder ohne Spacer an der Oberfläche des festen Trägers erfolgt erfindungsgemäß durch kovalente Bindung und betrifft gleichermaßen sowohl die in situ-Synthese von z.B. Oligonucleotiden als auch das Aufpropfen zuvor synthetisierter Nucleotidfolgen unabhängig von der jeweiligen Länge und tatsächlichen Beschaffenheit der als Sonden und/oder Primer dienenden Nucleinsäuren.

Beispielsweise kann ein Glasträger in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. "Linker"), die z.B. eine Halogensilan- (z.B. Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Glasoberfläche aufweisen, getaucht werden.

Das verwendbare bifunktionelle Silan unterliegt keinen besonderen Beschränkungen. In Frage kommen alle Silane, die am Siliciumatom ein(e), zwei oder drei hydrolysierbare(s) Atom(e) oder Gruppe(n) aufweisen, beispielsweise Halogenatome, C₁-C₄-Alkoxy-, C₁-C₄-Acyloxy- oder Aminogruppen.

Konkret kann zum Beispiel Isocyanopropyltrimethoxysilan oder 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan auf einen Glasträger aufgebracht werden.

- 5 Die zweite funktionelle Gruppe des bifunktionellen Silans unterliegt ebenfalls keinen besonderen Beschränkungen und wird nach Maßgabe des zu immobilisierenden Proben- oder Sondenmoleküls (z.B. Nucleinsäuren) gewählt. Beispiele sind zu nucleophilen Substitutionsreaktionen, nucleophilen Additionsreakti-
- 10 onen, Diels-Alder-Reaktionen oder radikalischen Substitutionsreaktionen fähige reaktive Gruppen. Konkrete Beispiele sind reaktive Doppelbindungen, Diengruppen, dienophile Gruppen, Epoxy-, Aldehyd- Hydroxy-, Carbonsäure-, Aktivester-, Amino, Disulfid-, Thiol-, Aziridin-, Azlacton-, Isoöcyanat-, Isothio-
- 15 cyanat-, Azidgruppen und reaktive Austrittsgruppen.

Diese und weitere bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von Proben- oder Primer/Sonden-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Träger-

20 oberflächen sind dem Fachmann gut bekannt, vgl. beispielsweise "Bioconjugate Techniques" von G. T. Hermanson, Academic Press 1996.

Für Nylonmembranen können z.B. Oligonucleotide mit Oligo-(dT)-

25 Schwanz am 5'-Ende verwendet werden. Durch UV-Bestrahlung werden die Thymin-Basen des Oligo-(dT)-Schwanzes kovalent mit primären Aminen in der Nylonmembran verknüpft.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen

30 Verfahrens zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation liegen auf dem verwendeten Festphasen-DNA-Microarray alle oder einzelne der zur Durchführung des Verfahrens erforderlichen PCR-Reagenzien bzw. -

Komponenten, d.h. die DNA-Polymerase, z.B. die thermostabile Taq-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), geeignete Puffersubstanzen und sämtliche Desoxynucleosidtriphosphate und die äußeren Primer, stabil und reversibel dehydratisiert auf der Oberfläche vor.

Es können beliebige, beispielsweise handelsübliche, PCR-Reagenzien verwendet werden. Die Aufbringung auf den festen Träger erfolgt nach herkömmlichen Verfahren, beispielsweise durch Aufpipettieren. Anschließend wird dehydratisiert, beispielsweise durch Trocknen an der Luft, im Vakuum oder im Trockenschrank, über einem üblichen Trocknungsmittel in einen Exsikkator oder durch Lyophilisation (Gefriertrocknung). Die Lyophilisation ist bevorzugt, da es sich um ein besonders schnelles und schonendes Dehydratisierungsverfahren handelt. Die Endkonzentrationen können einfach eingestellt werden, indem die PCR-Reagenzien in so konzentrierterer Form aufgebracht werden, daß sich nach der Rehydratisierung in einem bestimmten Volumen Flüssigkeit die gewünschten Reaktionsparameter wie insbesondere Konzentrationen und pH-Wert ergeben.

Die Aufbringung kann auch räumlich getrennt erfolgen.

Die PCR-Reagenzien sind auf dem festen Träger über lange Zeit, z.B. mindestens 6 Monate, ohne Kühlung stabil.

Die inneren Primer sind geeigneterweise bereits im voraus (d.h. vor der Aufbringung und Dehydratisierung der PCR-Reagenzien) kovalent auf der Oberfläche des festen Trägers gebunden bzw. immobilisiert.

Im Gebrauch werden die in der zu analysierenden Probe gegebenenfalls vorhandenen Proben-Nucleinsäuren in wäßriger Lösung

zugegeben, wodurch die PCR-Reagenzien rehydrieren und die Amplifikation im Falle des Vorhandenseins einer vom Design des analytischen Ansatzes antizipierten „Template“-Gegensequenz auf dem festen Träger abläuft, ohne daß die Zugabe weiterer
5 Reagenzien notwendig ist.

Die Analyse/Detektion erfolgt nach einer bevorzugten Ausführungsform mit Hilfe von kovalent an dem Festphasen-DNA-Microarray als Extensionsprodukte gebildeten und markierten
10 DNA-Sequenzen und durch Bestimmung der Lokalisierung der Markierung auf der Oberfläche wie beispielsweise aus EP 0 373 203 bekannt.

Beispielsweise kann ein Fluorochrom als Marker in das Amplikon
15 eingebaut werden, dessen Fluoreszenzemission dann detektiert oder gemessen wird. Da der Einbau der Markierung ortsgebunden erfolgt, können die Markierungsreaktionen, gewünschtenfalls auch in Echtzeit, nachgewiesen bzw. beobachtet werden.

20 Die Markierungs- und Detektionstechniken unterliegen keinen besonderen Beschränkungen. Beispielsweise können radioaktiv oder fluoreszenzmarkierte Nucleotide verwendet werden. Die Fluoreszenzmarkierung hat dabei den Vorteil, daß keine besonderen Schutzvorkehrungen wie beim Arbeiten mit radioaktivem
25 Material getroffen werden müssen. Der Nachweis der Hybridisierung kann beispielsweise durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von digoxigenin-
30 markierten spezifischen Sonden (Oligonucleotiden). Der Nachweis der Hybridisierung kann hier beispielsweise durch eine sich anschließende Antikörper- und Farbreaktion erfolgen, z.B. mit Hilfe eines poly- oder monoklonalen Digoxigenin-

Antikörpers, der z.B. mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Die alkalische Phosphatase setzt beispielsweise Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) oder 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) unter Bildung eines blauen Farbstoffs um.

Der zur Ausführung eines der erfindungsgemäßen Verfahren vorgeschlagene Festphasen-DNA-Microarray liegt in weiterer Ausgestaltung in Form eines sog. "Lab-on-a-Chip"-Systems vor, bei dem alle notwendigen Einrichtungen zum Mischen der Reaktionsteilnehmer sowie zur Temperaturregelung, ggf. einschließlich einer Steuereinheit für einzelne oder alle Einrichtungen, auf dem Microarray integriert sind. Ein solches, für den erfindungsgemäßen Einsatz grundsätzlich geeignetes System wird beispielsweise von Köhler et al. in transcript Laborwelt, Nr. 2 (2000), S. 5 ff. "Chipthermocycler" beschrieben und kann vom Fachmann in Kenntnis der vorliegenden Erfindung ohne zumutbaren Aufwand leicht konfiguriert und betrieben werden. Alternativ kann die Steuerung der erforderlichen Verfahrensparameter vollständig oder teilweise extern wie z.B. in einer Rechneranlage erfolgen.

Kurz zusammengefaßt vereinen das allgemeine erfindungsgemäße Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation durch verschachtelte PCR in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem sowie die für bestimmte Anwendungsgebiete modifizierten Ableitungen desselben in sich die Sensitivität der PCR, die Parallelität der Mikroarrayanalytik und die Spezifität des Systems Primer/"Template"/Polymerase mit dem Vorteil der stabilen dehydrierten Bindung von Reagenzien auf einem Microarray.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele unter Bezugnahme auf die anhängenden Figuren nachfolgend näher erläutert. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Beispiele lediglich der Veranschaulichung einzelner bestimmter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dienen, nicht aber als Beschränkung des allgemeinen erfinderischen Gedankens aufgefasst werden soll. Vom Fachmann können zahlreiche Modifikationen und Optimierungen der konkreten Ausführungsbeispiele vorgenommen werden, ohne den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung, der allein durch die anhängenden Ansprüche festgelegt wird, zu verlassen.

Beispiel 1

Abb.1: Spezifischer Nachweis einer bekannten Sequenz. Die obere Hälfte der Abb. schematisiert die Vorgänge während der Amplifikation, die untere Hälfte die Situation zum Zeitpunkt der Detektion. Es sind mindestens 1 Lösungsprimerpaar (P_1 und P_2) und mindestens 1 Festphasenprimer (P_3) vorhanden. P_3 hat seine Binderegion innerhalb des Amplikons, welches von P_1 und P_2 amplifiziert wird. Da nach jedem Zyklus bei 90 - 95°C denaturiert wird, was extremen Waschschritten (strippen) entspricht, bleiben nach Ende der Reaktion nur die kovalent gebundenen Reaktionsprodukte an der Festphase zurück (vgl. Abb. 1 unten). Alle anderen Reaktionsprodukte befinden sich im Überstand und bleiben bei der Detektion unberücksichtigt.

Das vorliegende Beispiel betrifft den spezifischen Nachweis der Anwesenheit einer bekannten, für Salmonellen charakteristischen Sequenz in einer zu analysierenden Lebensmittelprobe. Die Aufbereitung des Probenmaterials erfolgt in Übereinstimmung mit der DIN-Vorschrift 10135, welche speziell den Nachweis von Salmonellen betrifft.

Die in 100 µl wäßriger Lösung aufgenommene Proben-DNA wird auf einen Microarray aus aktiviertem Glas, auf dem sich bereits sämtliche übrigen Reaktionsteilnehmer in lyophilisierter Form befinden, wobei alle Komponenten mit Ausnahme der kovalent an der festen Phase gebundenen P₃-Primer reversibel immobilisiert sind, aufpipettiert.

Durch Zugabe der Probenlösung werden die lyophilisierten Komponenten rehydratisiert und stehen dem folgenden Reaktionsablauf mit folgenden Konzentrationen zur Verfügung. Die Primer P₁ und P₂ liegen in Konzentrationen von 100 nM bzw. 600 nM vor, während der Primer P₃ eine Konzentration von 50 pM aufweist. In der wäßrigen Probenlösung mit einem pH-Wert von 8,3 befinden sich die üblichen PCR-Standardpufferkomponenten 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 1,5 mM MgCl₂, sowie die drei Nucleotide dATP, dCTP und dGTP in einer jeweiligen Konzentration von 200 µM. Die dTTP-Konzentration des Systems beträgt 75 µM, diejenige an Biotin-dUTP beträgt 50 µM. Weiterhin umfasst das System 6,4 Einheiten (units) Taq-Polymerase (AmpliTaq™ - Gold, Perkin-Elmer).

Die Reaktion wird durch eine 10 Minuten lange Aktivierung der Polymerase gestartet und läuft bei einer jeweiligen Annealingtemperatur von 65°C und einer jeweiligen Denaturierungstemperatur von 94°C über 50 Zyklen, wobei ein jeder Zyklus unter Verwendung eines Thermocyclers PTC 200 (MJ Research) die folgenden Inkubationszeiten umfasst: 45 Sekunden 94°C, 60 Sekunden 65°C, 120 Sekunden bei 72°C.

Das in die kovalent gebundenen Produkte eingebaute Biotin wird nach der Reaktion mittels Streptavidin-Fluorochrom-Konjugat in an sich bekannter Weise angefärbt und einer Detektion zugeführt.

Beispiel 2

Abb.2: Allotypbestimmung: Spezifische Bestimmung der Identität eines 3'-ständigen Nucleotids mittels Primerfamilien. Die obere Hälfte der Abb. schematisiert die Vorgänge während der Amplifikation, die untere Hälfte die Situation zum Zeitpunkt der Detektion.

Unter den in Beispiel 1 genannten Reaktionsbedingungen wird eine Konsensus-PCR (vgl. z.B. P. Wordsworth, „Techniques used to define human MHC antigens: polymerase chain reaction and oligonucleotide probes“, *Immunol Lett*, 1991 Jul;29(1-2):37-9) durchgeführt, bei der alle 300 Varianten vom insgesamt 270 Nucleotide umfassenden Exon II des DR-Gens (HLA-Klasse II) amplifiziert werden. Die intern bindenden Festphasenprimer P3 besitzen Längen von 18 bis 27 Nucleotide und sind Mitglieder von insgesamt 250 Familien, deren Anzahl benötigt wird, um über Redundanzen eine eindeutige Identifizierung eines Genotyps auch bei Heterozygotie zu ermöglichen, wobei sich jedes einzelne Mitglied der Primerfamilie hinsichtlich des Nukleotids an seinem 3'-Ende von jedem anderen Mitglied unterscheidet (vgl. Abb. 2).

Aufgrund der im wesentlichen gleichen Länge der vorhandenen Primer beträgt die Annealingtemperatur der Amplifikationsreaktion 65°C, so daß die gewünschten Extensionsprodukte unter den gewählten Bedingungen bevorzugt nur an denjenigen definierten Positionen des DNA-Microarrays gebildet werden, welche durch die Anwesenheit des zu der zu bestimmenden Variantensequenz im wesentlichen exakt komplementären Primers gekennzeichnet sind.

Im Anschluss an die Detektion gemäß Beispiel 1 wird das erhaltene Fluoreszenzmuster mit den anhand der Einzelsequenzen der

verschiedenen Allele zu erwartenden Signalmusterpermutationen verglichen. Die jeweils durch den Vergleich aufgefundenen Übereinstimmungen ermöglichen die zweifelsfreie Identifizierung der zu untersuchenden Genotyp-Varianten.

5

Beispiel 3

Abb.3: "Sequence Tag Aquisition": Spezifische Signatur-Sequenzierung ausgehend von einer bekannten Primersequenz mittels Primerfamilien. Die obere Hälfte der Abb. schematisiert die Vorgänge während der Amplifikation, die untere Hälfte die Situation zum Zeitpunkt der Detektion. In der oberen Hälfte sind die Nebenreaktionen an der Festphase im Gegensatz zu Abb. 1 und 2 aus Übersichtgründen nicht dargestellt.

15

Wie bei Beispiel 2 wird eine Konsensus-PCR durchgeführt. In diesem Fall wird die 16S-rDNA eines unbekannten Bakteriums amplifiziert. Das Amplikon ist in diesem Fall ca. 1200 bp lang. Sequenziert werden soll jedoch lediglich ein interner Bereich von 6 Nuklotiden in einem variablen, d.h. nicht konservierten Bereich. Dieser unbekannte Sequenzabschnitt wird ausgehend von einer konservierten Region ermittelt. Hierzu werden Festphasenprimerfamilien verwendet, die sich, ausgehend von einer konservierten Region, am 3'-Ende jeweils durch die letzte Base unterscheiden, so daß sich insgesamt 4^6 entsprechend 4096 Varianten ergeben (vgl. Abb. 3). Die Annealingtemperatur und die Gesamtlänge der Primer sind an die gewünschte Spezifität angepaßt (s. Beispiel 2). Wie in Beispiel 2 angegeben, weisen die Primer Längen zwischen 18 und 27 Nukleotiden auf.

25

Die Detektion erfolgt wie zuvor in Beispiel 2 beschrieben.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt auf der Grundlage des Microarray-Designs. Durch die vom Design vorgegebene Gruppierung der einzelnen Reaktionsbereiche in Felder, die mit der ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften und sechsten Position der zu bestimmenden Sequenz korrespondieren, erfolgt die Bestimmung des 6 Nukleotide umfassenden DNA-Teilbereichs durch sukzessives Ablesen der für jedes Feld erhaltenen Daten. Mit anderen Worten wird zuerst das Feld ausgewertet, in welchem ausgehend vom Design des Arrays die erste zu bestimmende Base ermittelt wird, bevor in Kenntnis des Ergebnisses aus diesem ersten Feld die Bestimmung der Base an der zweiten Position der zu ermittelnden Sequenz vorgenommen wird, u.s.w. Die jeweilige Untersuchung eines Feldes erfolgt durch Erfassung und Zuordnung der größten gemessenen Signalstärke. Selbstverständlich können die Feldmessungen auch parallelisiert ablaufen. Ergänzend wird in diesem Zusammenhang auf Abb. 3 verwiesen.

Beispiel 4

Abb.4: Signatur-Sequenzierung ausgehend von einer unbekannten Sequenz mittels Primer-Hexameren. Die obere Hälfte der Abb. schematisiert die Vorgänge während der Amplifikation, die untere Hälfte die Situation zum Zeitpunkt der Detektion. In der oberen Hälfte sind die Nebenreaktionen an der Festphase im Gegensatz zu Abb. 1 und 2 aus Übersichtgründen nicht dargestellt.

Eine unbekannte Sequenz wird mittels spezifischer Primer nach inverser PCR amplifiziert. Die inverse PCR ist im Stand der Technik bekannt (vgl. z.B. C. R. Newton, A. Graham: "PCR", Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford 1994, Seite 120ff. und die dort angegebenen weiteren Literaturstellen). In diesem Fall wird die "Border"-Sequenz eines inte-

grierten Transgenkonstruktes im Mais-Kerngenom bestimmt. Das Amplikon umfaßt 500 bp. Die Festphasenprimer P₃ sind alle 6 Nucleotide lang und unterscheiden sich in ihrer Sequenz. Es sind 4096 unterschiedliche Festphasenprimervarianten auf dem
5 Chip. Es werden 1000 Kopien der Mais-DNA eingesetzt. Wiederum werden Standard-PCR-Bedingungen angewandt (s.o.). Allerdings wird die Annealingtemperatur nach Zyklus 20 auf 30°C erniedrigt, um die Festphasen-Amplifikation mit den Hexameren zu begünstigen.

10

Die Bestimmung der Sequenz erfolgt anschließend durch Ermittlung der spezifisch gebildeten Extensionsprodukte, Zuordnung dieser ermittelten Werte zu den definierten Positionen des DNA-Microarrays, und Zusammenstellung der zu bestimmenden Se-
15 quenz im Rahmen einer ggf. Computer-unterstützten Kombinatorik, wobei die tatsächliche Aneinanderreihung der Einzeldaten zur Gesamtsequenz unter Nutzung der jeweils überlappenden Sequenzbereiche vorgenommen wird.

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur spezifischen Bestimmung von DNA-Sequenzen mittels paralleler Amplifikation in einem kombinierten Flüssigphasen/Festphasen-DNA-Microarraysystem, indem man eine verschachtelte Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von x PCR-Primersätzen aus jeweils mindestens 3 PCR-Primern P_{11} , P_{21} , P_{31} , P_{12} , P_{22} , P_{32} , P_{13} , P_{23} , P_{33} , ... P_{1x} , P_{2x} , P_{3x} durchführt, wobei x eine natürliche Zahl bedeutet und der Anzahl der zu bestimmenden DNA-Sequenzen entspricht, und wobei für jeden der x PCR-Primersätze

(a) zwei äußere PCR-Primer P_1 , P_2 so ausgewählt werden, daß sie an stromaufwärts und stromabwärts der zu amplifizierenden Ziel-DNA-Sequenz liegende DNA-Teilsequenzen hybridisieren,

(b) ein innerer PCR-Primer P_3 so ausgewählt wird, daß er an eine innerhalb der zu bestimmenden Ziel-DNA-Sequenz liegende DNA-Teilsequenz hybridisiert und in der Lage ist, ein P_3 -Extensionsprodukt zu bilden, und

(c) die x äußeren PCR-Primer P_{11} , P_{21} , P_{12} , P_{22} , P_{13} , P_{23} , ... P_{1x} , P_{2x} in der flüssigen Phase gegenüber den x inneren PCR-Primern P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} im Überschuß vorliegen, und

(d) die x inneren PCR-Primer P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} an x räumlich beabstandeten definierten Positionen unter Bildung eines DNA-Microarrays irreversibel an eine Festphase gebunden vorliegen, und

(e) man die Bestimmung durch Ermittlung des Vorhandenseins eines P_3 -Extensionsproduktes an der definierten Position des DNA-Microarrays durchführt.

2. Verfahren zur Bestimmung von Punktmutationen mittels paralleler Amplifikation, bei dem man

5 (a) unter Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 eine Polymerasekettenreaktion durchführt, durch welche sämtliche x zu bestimmenden Varianten amplifiziert werden, wobei

(b) mindestens P_3x Primerfamilien verwendet werden, wobei
10 sich jedes einzelne Mitglied P_3x-N der Primerfamilie hinsichtlich des Nukleotids an seinem 3'-Ende von jedem anderen Mitglied unterscheidet, wobei N die unterschiedlichen Nukleotide A, C, G und T bezeichnet, und die Annealingtemperatur der Amplifikationsreaktion so ausgewählt wird, daß die gewünschten
15 Extensionsprodukte nur an denjenigen definierten Positionen des DNA-Microarrays gebildet werden, welche durch die Anwesenheit des zu der zu bestimmenden Punktmutation im wesentlichen exakt komplementären Primers gekennzeichnet sind,

20 (c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Bestimmung der Punktmutation gemäß Schritt (e) des Anspruchs 1 erfolgt.

25

3. Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von DNA-Teilbereichen mittels paralleler Amplifikation, bei dem

(a) unter Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird, durch welche sämtliche
30 x zu bestimmenden Sequenzen amplifiziert werden, wobei

(b) mindestens $P_3 \times$ Primerfamilien verwendet werden, wobei sich jedes einzelne Mitglied $P_3 \times -N, \dots P_3 \times -N_n$ der Primerfamilie hinsichtlich seiner 1 bis n Nukleotide am 3'-Ende von jedem anderen Mitglied unterscheidet, wobei N die unterschiedlichen Nukleotide A, C, G und T bezeichnet, und n die Länge der zu bestimmenden Sequenz(en) angibt, und die Annealingtemperatur der Amplifikationsreaktion so ausgewählt wird, daß die gewünschten Extensionsprodukte nur an denjenigen definierten Positionen des DNA-Microarrays gebildet werden, welche durch die Anwesenheit des zu der zu bestimmenden Sequenz im wesentlichen exakt komplementären Primers gekennzeichnet sind,

(c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exonuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Ermittlung der zu bestimmenden Sequenz(en) gemäß Schritt (e) des Anspruchs 1 erfolgt.

4. Verfahren zur Bestimmung der Sequenz von unbekannten DNA-Teilbereichen mittels paralleler Amplifikation, bei dem

(a) unter Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird, durch welche die Abfolge sämtlicher n Nukleotide der zu bestimmenden Sequenzen ermittelt wird, wobei

(b) ein sämtliche Permutationen umfassender Satz von inneren Primern P_3 mit einer bestimmten Länge n verwendet wird, wobei mehrere Primer mit einer jeweils unterschiedlichen Region der zu bestimmenden Sequenz exakt hybridisieren und Extensionsprodukte definierter Länge bilden können, und sich jeder einzelne

dieser Primer an einer anderen definierten Position des DNA-Microarrays befindet,

(c) zur Amplifikation eine DNA-Polymerase ohne 3'→5'-Exo-nuclease-Aktivität verwendet wird, und

(d) die Bestimmung der Sequenz durch Ermittlung der in Schritt (b) gebildeten Extensionsprodukte, Zuordnung dieser ermittelten Werte zu den definierten Positionen des DNA-Microarrays, und Zusammenstellung der zu bestimmenden Sequenz im Rahmen einer ggf. Computer-unterstützten Kombinatorik erfolgt, wobei die tatsächliche Aneinanderreihung der Einzeldaten zur Gesamtsequenz unter Nutzung der jeweils überlappenden Sequenzbereiche vorgenommen wird.

15

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die x äußeren PCR-Primer P_{11} , P_{21} , P_{12} , P_{22} , P_{13} , P_{23} , ... P_{1x} , P_{2x} gegenüber den x inneren PCR-Primern P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} in einem 10^2 - bis 10^{12} -fachen, vorzugsweise in einem 10^4 -fachen

20

Überschuß vorliegen.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Schmelztemperaturen der zwei äußeren PCR-Primer P_1 und P_2 gegenüber derjenigen des inneren Primers P_3 unterschiedlich

25

sind.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Festphase unter Metalloberflächen, mit SiO_2 -bedampften Metalloberflächen, Metall/Halbmetalloxidoberflächen, Glasoberflächen, Polymeroberflächen, Nylonmembranen oder Nitrocellulosemembranen ausgewählt ist.

30

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Metalloberfläche aus Aluminium oder Gold, die Metall/Halbmetalloxidoberfläche aus Al_2O_3 oder SiO_2 , die Glasoberfläche aus Quarzglas und die Polymeroberfläche aus Polypropylen, Polymethylmethacrylat oder Cycloolefin-Copolymeren ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die x inneren PCR-Primer P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} an eine Metall/Halbmetalloxidoberfläche oder Glasoberfläche über ein bifunktionelles Silan, das am Siliciumatom ein(e), zwei oder drei hydrolysierbare(s) Atom(e) oder Gruppe(n) aufweist, gebunden sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die hydrolysierbaren Atome oder Gruppen Halogenatome, C_1 - C_4 -Alkoxy-, C_1 - C_4 -Acyloxy- oder Aminogruppen umfassen.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die zweite funktionelle Gruppe des bifunktionellen Silans nucleophile Substitutionsreaktionen, nucleophile Additionsreaktionen, Diels-Alder-Reaktionen oder radikalische Substitutionsreaktionen eingehen kann.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei es sich bei der zweiten funktionellen Gruppe des bifunktionellen Silans um eine reaktive Doppelbindung, Diengruppe, dienophile Gruppe, Epoxy-, Aldehyd-, Hydroxy-, Carbonsäure-, Aktivester-, Amino, Disulfid-, Thiol-, Aziridin-, Azlacton-, Isocyanat-, Isothiocyanat-, Azidgruppe oder reaktive Austrittsgruppe handelt.

13. Festphasen-DNA-Microarray zur Ausführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, auf dem an x räumlich beabstandeten Positionen x innere PCR-Primer P_{31} , P_{32} , P_{33} , ... P_{3x} irreversibel an die Festphase gebunden sind.

14. Festphasen-DNA-Microarray nach Anspruch 13, bei dem außerdem einzelne oder alle der für die durchzuführenden Reaktion(en) erforderlichen Komponenten wie DNA-Polymerase, geeignete Puffersubstanzen, sämtliche Desoxynucleosidtriphosphate und die x äußeren PCR-Primer P_{11} , P_{21} , P_{12} , P_{22} , P_{13} , P_{23} , ... P_{1x} , P_{2x} reversibel dehydratisiert auf der Oberfläche vorliegen.

15. Festphasen-DNA-Microarray nach Anspruch 13 oder 14 in Form eines "Lab-on-a-Chip"-Systems, bei dem ferner Einrichtungen zum Heizen, Kühlen, Temperaturregeln, Mischen und Messen auf dem Microarray integriert sind.

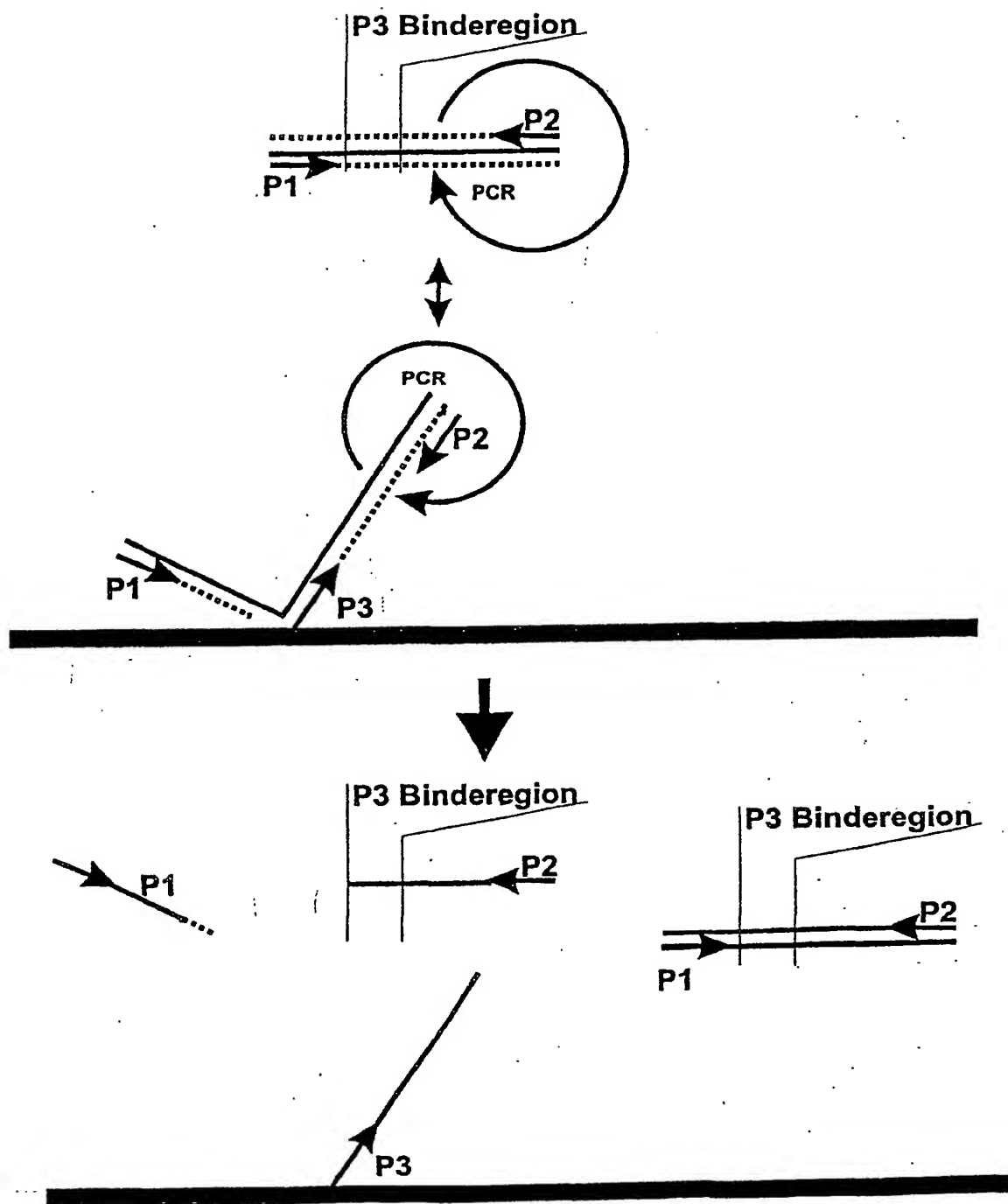


Abb. 1

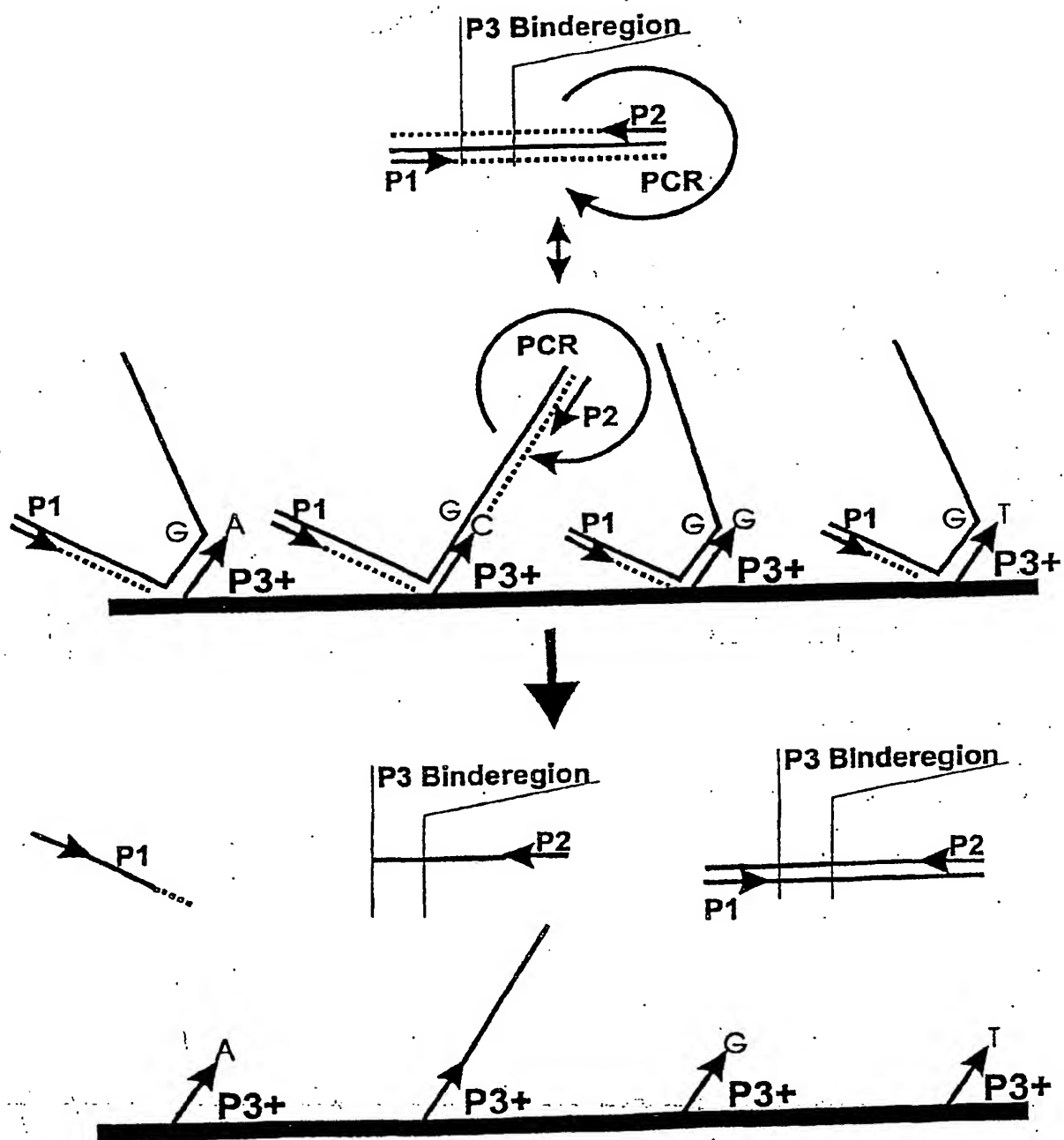


Abb. 2

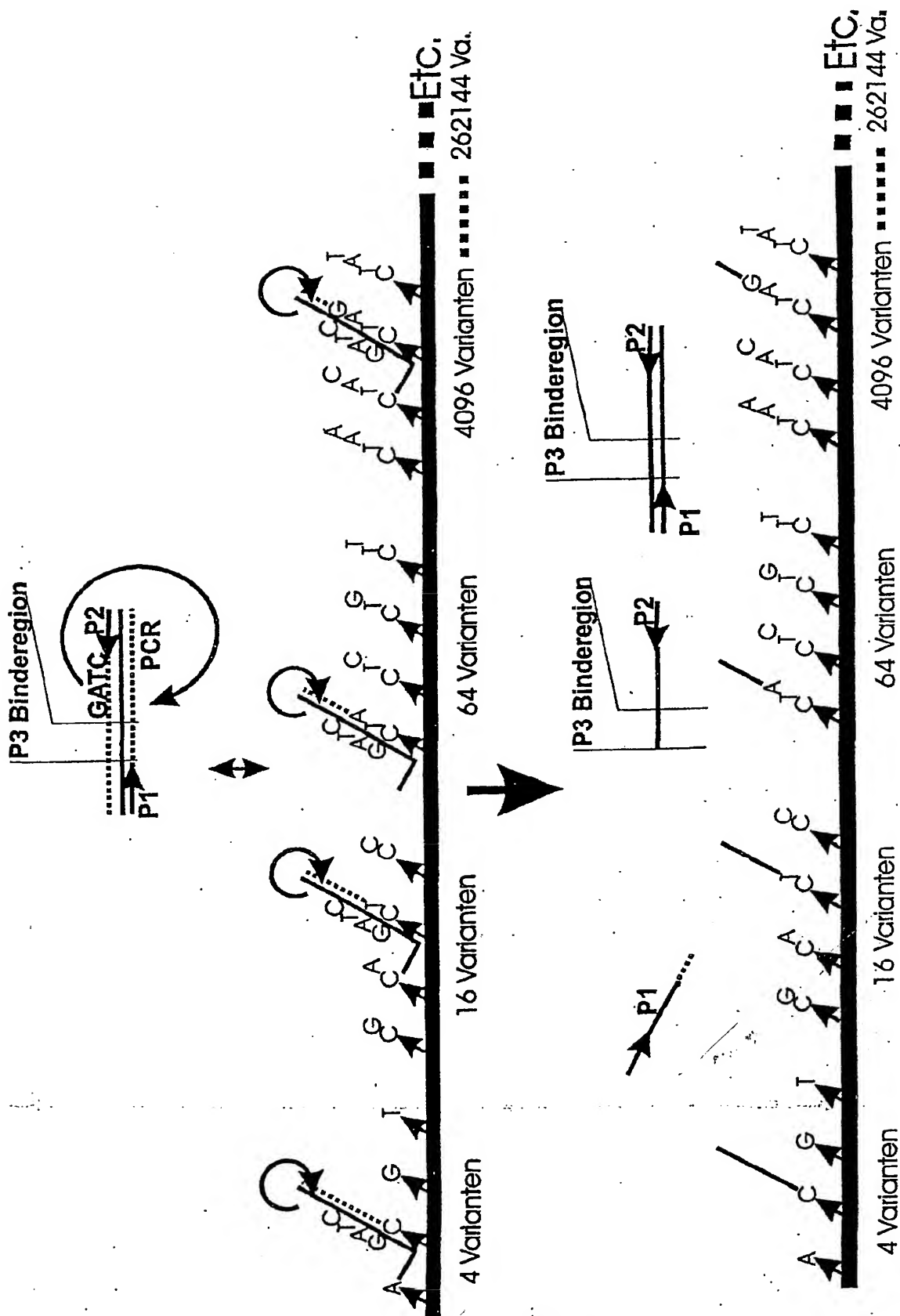


Abb. 3

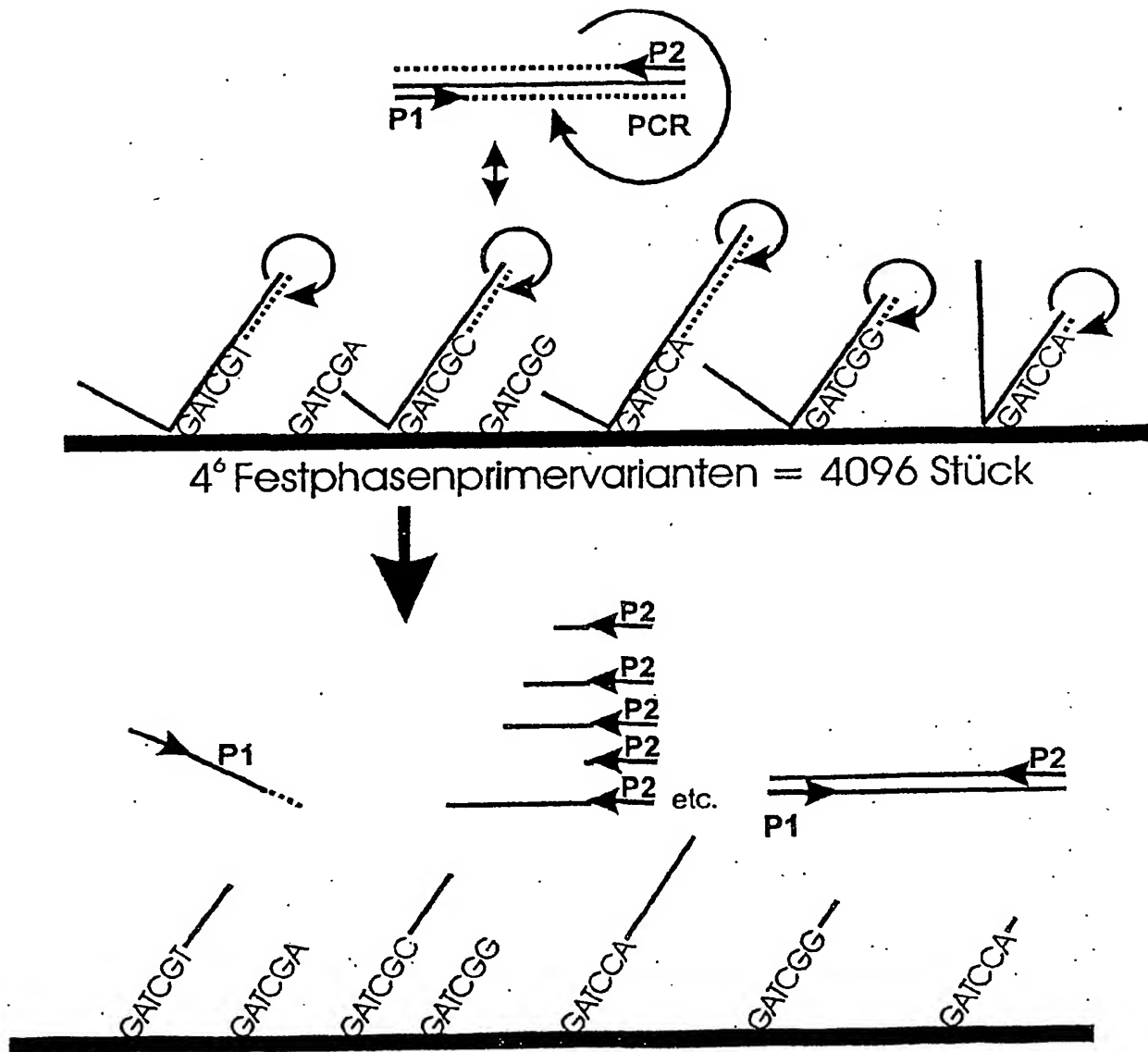


Abb. 4

Abb.5

